

骨肉腫に対する多剤併用療法の基礎的研究

—ヒト骨肉腫由来培養細胞 OST 株についての flow cytometry による検討—

金沢大学医学部整形外科科学講座 (主任：野村 進教授)

三 平 伸 一

(昭和61年1月27日受付)

骨肉腫に対する、抗癌剤併用治療法の至適投与条件の確立を目的として、ヒト骨肉腫細胞 OST 株に対し、臨床上骨肉腫の治療に広く使用されている Methotrexate (MTX), Vincristine (VCR), Adriamycin (ADM) を複数に組み合わせて作用させ、細胞回転への影響を flow cytometry (FCM), 生細胞数測定、細胞形態変化観察より検討し、以下の結果を得た。MTX を先行して作用させたのち VCR または ADM を作用させた場合に、MTX が OST 細胞を G1-S 移行期に同調集積させるため、細胞増殖抑制効果が顕著であった。ADM は殆んど OST 細胞を G2 期に集積させるため、ADM 作用後 MTX や VCR を作用させても、ADM 単独作用と同じ効果のみしか得られなかった。VCR を MTX, ADM に先がけて作用させた場合、著明な metaphase arrest は認められなかった。しかし、MTX を作用させた後 VCR を作用させる順序においては、metaphase arrest が効果的に惹起された。これらの結果から、3 剤交替併用投与では MTX, つづいて VCR, 最後に ADM を投与する順序が有用であり、細胞回転の立場からみても合理的であると考えられた。

Key words flow cytometry, osteosarcoma, combination chemotherapy

骨肉腫の治療は 1960 年以前は患肢切断術が主であったが、その結果については必ずしも満足するものではなく、当教室でも 5 年生存率は 10% 以下という成績であった¹⁾。

生存率が低い原因として、腫瘍原発巣の切除時すでに肺に潜在性転移が成立していることが考えられているが、その対策として抗癌剤投与の有効性が実証されてから、骨肉腫に対する化学療法が注目されるようになってきた。

骨肉腫に対する化学療法の歴史としては、まず抗癌剤の単独投与として、cyclophosphamide²⁾, phenylalanine mustard³⁾, mitomycin C⁴⁾, vincristine (VCR)⁵⁾, adriamycin (ADM)⁶⁾などが試みられたが、ADM のみにわずかに好結果が得られた以外、ほとんど効果は期待できなかった。1970 年代に入り、Jaffe ら⁷⁾は Djerassi⁸⁾が肺癌患者に対して行なった high dose methotrexate-citrovorum factor rescue 法を、骨肉腫肺転移患者の治療に適用し、5 年生存率を飛躍

的に向上せしめた。その後 VCR を methotrexate (MTX) に先がけて投与すると、MTX の細胞内取り込みが増加するとの報告⁹⁾があり、VCR が併用されるようになった。さらに、Rosen ら¹⁰⁾は、VCR-high dose MTX-citrovorum factor rescue 法に従って投与した後、2 週目に ADM を追加投与することによって単剤投与で誘導される腫瘍の耐性化や副作用の防止とともに、薬剤効果の増強が得られたと報告した。その後 Jaffe ら¹¹⁾多くの施設で VCR, MTX 及び ADM の 3 剤併用投与が行なわれるようになり、当教室においても 1977 年以来、Roswell Park Memorial Institute のプロトコルに準じて、前記 3 剤による併用投与を施行し、生存率の向上をみるに至っている^{11,12)}。

ところで、一般に悪性腫瘍に対する抗癌剤の多剤併用療法は、当初臨床上有効性を認めた薬剤を無作為に、あるいは、経験的に組み合わせるにすぎなかった。しかし、Bruce ら¹³⁾, Sinclair¹⁴⁾及び Wheeler ら¹⁵⁾によって抗癌剤の細胞回転に及ぼす影響が検討されるように

Abbreviations: ADM, adriamycin; FCM, flow cytometry; HE stain, hematoxylin eosin stain; MI, mitotic index; MTX, methotrexate; VCR, vincristine.

なり、昨今では細胞回転を考慮したうえでの併用投与法が大きな位置を占めるようになった^{16)~22)}。

しかし、従来細胞回転の研究は主として、オートラジオグラフィー法によって行なわれており、手技的に煩雑で、しかも長時間を要する欠点があった²³⁾。

近年、細胞周期における各期の DNA 量の差異を指標とし、Feulgen 染色した細胞核の蛍光量を測定することによって、各期における細胞数を測定する顕微分光測定法が考案され、さらに Dilla ら²⁴⁾によりコンピューター解析が可能となった。この flow cytometry (FCM) が開発されて以来、細胞周期の把握が短時間で正確に行なわれるようになり、抗癌剤の細胞周期に及ぼす影響が詳細に分析されるようになってきた^{25)~32)}。

当教室では、林ら³³⁾が Sr89 誘発骨肉腫を対象とする in vivo 実験で、また平井ら³⁴⁾はヒト骨肉腫培養細胞 OST 株を対象とする in vitro 実験で、それぞれ MTX, VCR 及び ADM の 3 剤が細胞周期に及ぼす影響を FCM によって解析し報告している。

今回著者は OST 株を対象とし、MTX, VCR, ADM の 3 剤の投与順序、組み合わせに関して抗癌剤の細胞周期に及ぼす影響と増殖抑制効果を、FCM によって検討し、多剤交替併用における至適投与法の確立を目的として研究を行なった。

材料および方法

I. 実験材料

1. 骨肉腫細胞

当教室の高瀬ら³⁵⁾により樹立され、以来継代保持されているヒト骨肉腫由来培養細胞 OST 株を使用した。この OST 株は紡錘形細胞像を示し、単層に増殖する培養株であり、その generation time は 40 時間である³⁶⁾。

2. 細胞培養

1) 培地

非働化 (56°C, 30 分) ウシ胎児血清を 20% 濃度に添加した市販合成培地 RPMI 1640 (pH7.0-7.4) を用いた。

2) 培養瓶

75 cm²組織培養フラスコ (Corning 社) 及び 8 cm²スライドガラス付き組織培養用フラスコ (Falcon 社) を使用した。

3) 培養方法

培養液 20 ml 中に 5×10^5 個の OST 株細胞を移植、37°C, 48 時間閉鎖的に静置培養し、単層に増殖した細胞を Ca^{++} 及び Mg^{++} を含まないリン酸緩衝塩類溶液 (PBS) にて 2 回洗浄した後、0.25% トリプシン溶液

にて処理し、剥離された細胞の浮遊液を、1000 rpm, 5 分間遠心後ただちに細胞数 $1.5-2.0 \times 10^5/\text{ml}$ になるように前記培養液中に再浮遊した。

3. 抗癌剤

代謝拮抗剤として、methotrexate (MTX, 日本レダリー) を、アルカロイド剤は vincristine (oncovin, 塩野義製薬) を、また抗癌性抗生物質は, adriamycin (adriacin, 協和酸酵) を使用した。

4. 抗癌剤の作用濃度及び時間

各抗癌剤は生理食塩水に溶解せしめ、それぞれ 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ・10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ・1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ・0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ・0.01 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 濃度液を調製した。この溶液 1 ml を前記培養液 19 ml に加え、5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 0.05 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 及び 0.005 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の薬剤含有培養液を調製した。

単剤作用の場合、細胞増殖抑制が認められた各薬剤の最少有効濃度を低濃度とし、その 10 倍量を高濃度とした (表 1)。また、2 剤及び 3 剤交替併用の場合、低濃度の薬剤の組み合わせを低濃度作用群、高濃度の組み合わせを高濃度作用群とした。すなわち低濃度群は、ADM 0.05 $\mu\text{g}/\text{ml}$, VCR 0.005 $\mu\text{g}/\text{ml}$, MTX 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ を含有し、高濃度群はそれぞれ 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 0.05 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 5.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ であった。

OST 株細胞に対する薬剤の作用時間は、一律に細胞の generation time の約半分に相当する 24 時間とした。

5. 増殖抑制試験

1) 単剤作用群

OST 株細胞を 48 時間静置培養後、各抗癌剤をそれぞれ単独で 24 時間作用させた後、薬剤を除去し、以後 96 時間まで逐次 DNA ヒストグラムの検討、生細胞数測定ならびに細胞像観察を行なった。

2) 2 剤及び 3 剤交替作用群

OST 株細胞を 48 時間静置培養後、第 1 の抗癌剤を 24 時間作用させた後除去し、次いで第 2 の抗癌剤を同様に 24 時間作用させてから薬剤を除去し、さらに新鮮培地中で 96 時間培養した。その間、一定時間ごとに単剤作用群の場合のごとく諸項目について検討した。また、3 剤交替併用の場合には第 2 の抗癌剤を除去後さら

Table 1. Dose levels of anticancer agents

Anticancer agent	Final concentration ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	
	Low dose	High dose
Methotrexate (MTX)	0.5	5.0
Vincristine (VCR)	0.005	0.05
Adriamycin (ADM)	0.05	0.5

に第3の抗癌剤を24時間作用させた後、同様に処理し検討した。なお、単剤及び多剤併用作用群と併行して、それぞれ抗癌剤非含有培地での細胞について、同様の処理操作を行ない、これを対照群とした。

6. FCM 測定

抗癌剤添加培地の培養細胞について検討した。培養細胞を遠心後細胞沈渣に50%メタノール1.0 mlを加え固定し、次いでKrishanら³⁷⁾の方法に従い、5倍量のpropidium iodide溶液(0.05 mg/ml, 0.1%クエン酸ソーダ溶液)でOST細胞核を染色後、Flow cytometer (Instruments Cytograf System 50H)に投入し、 1.5×10^5 個の細胞を計測してDNAヒストグラムを得た。DNAヒストグラムと細胞回転における各周期の関係は図1に示した。

7. 生細胞数の測定

自動血球アナライザー(Coulter Electronics)によって全細胞数を測定し、またトリパンブルー排除試験によって生細胞数を計測して、生細胞率を算定した。

8. 細胞像観察

抗癌剤添加培地を入れた8 cm²スライドガラス付き組織培養用フラスコ中で培養したOST株細胞を、倒立位相差顕微鏡下で細胞の形態学的変化を継続的に観

察し、さらに培養液を除去後、95%エタノールで固定し、HE染色を施した標本について、mitotic index (MI) の算定、細胞の形態変化などを検討した。

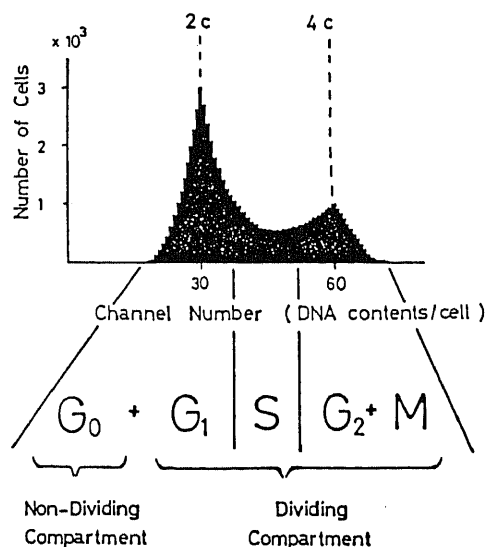


Fig. 1. DNA histogram by flow cytometry (FCM).

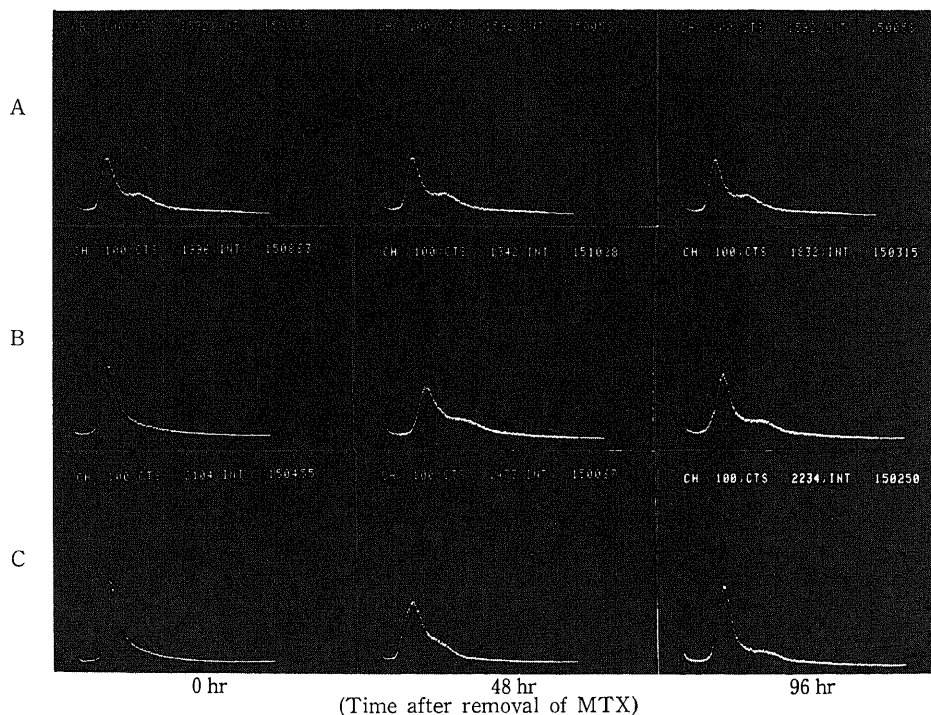


Fig. 2. DNA histograms of OST cell line treated with MTX *in vitro*. A, no addition; B, low dose of MTX; C, high dose of MTX.

成 績

I. 対照群

1. DNA ヒストグラム

継代培養直後では、2C (G0 期及び G1 期細胞集団) にピークをもつ単峰性に近いパターンが出現したが、24 時間後には定型的な 2C と 4C (G2 期及び M 期細胞集団) の 2 峰性パターンを呈し、48 時間、96 時間後にもほぼ同様のヒストグラムがみられた(図 2)。しかし培養 132 時間後から徐々に 4C の減少が認められ、168 時間後では 4C のピークは消失し、2C 単峰性に近いパターンが示された。

2. 生細胞数

培養 24 時間後から生細胞数は指数函数的に増大したが、120 時間後に増殖速度がやや低下し、182 時間後にはプラトーになった(図 3)。

3. 細胞像(検鏡観察)

円形または楕円形の核を有する紡錘形細胞が大部分を占め、ときに多核巨細胞も散見された。MI は、培養直後では、1.0%であったが、細胞数の増加とともに高くなり、最大値 1.6%に達した。その後増殖度の低下とともに減少し、プラトーになった時点では 1.0%に復した(写真 1)。

II. 単剤作用群

1. MTX

1) DNA ヒストグラム

高濃度及び低濃度ともに薬剤の除去直後には、4C が減少した 2C 単峰性に近いパターンが出現し、わずかに 3C (S 期細胞集団を 3C と表現) の増加が認められたが薬剤除去 48 時間後には 4C が増加し、対照群のヒストグラムに近いパターンを呈した(図 2)。

2) 生細胞数

MTX の高濃度及び低濃度作用下では、わずかに増殖が抑制されたが、薬剤の除去とともに急速に増殖が認められた(図 3)。

3) 細胞像

MI は 0.3%と対照群に比しやや減少しているが、細胞形態には著明な変化は認められなかった(写真 1)。

2. VCR

1) DNA ヒストグラム

高濃度及び低濃度作用下で、薬剤除去直後には 3C 及び 4C の増加傾向が認められたが、除去 48 時間後には 2C と 4C の 2 峰性に近いパターンを示し、対照群同様のヒストグラムにほぼ復元した(図 4)。

2) 生細胞数

薬剤共存下では、増殖抑制効果は著明であったが、

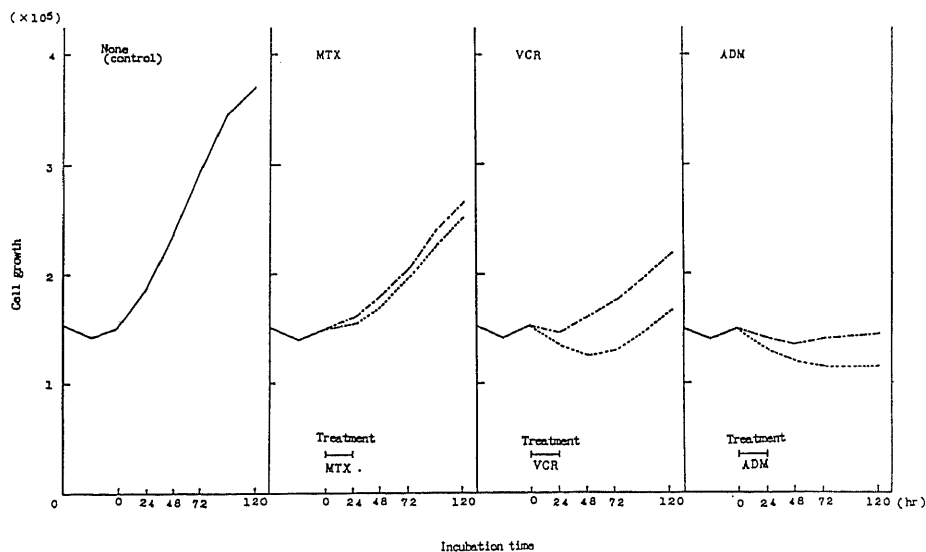


Fig. 3. Growth in culture of OST cell line treated with MTX, VCR or ADM.

Osteosarcoma cells $1.5-2.0 \times 10^5$ were inoculated into culture medium and incubated at 37°C for 48 hours. Anticancer agent was added to the cell culture at the stated doses and then incubated. After 24-hours' incubation the agent was washed out and the treated sarcoma cells were incubated at 37°C after adding fresh culture medium.

(—, none; ·····, high dose; ---, low dose).

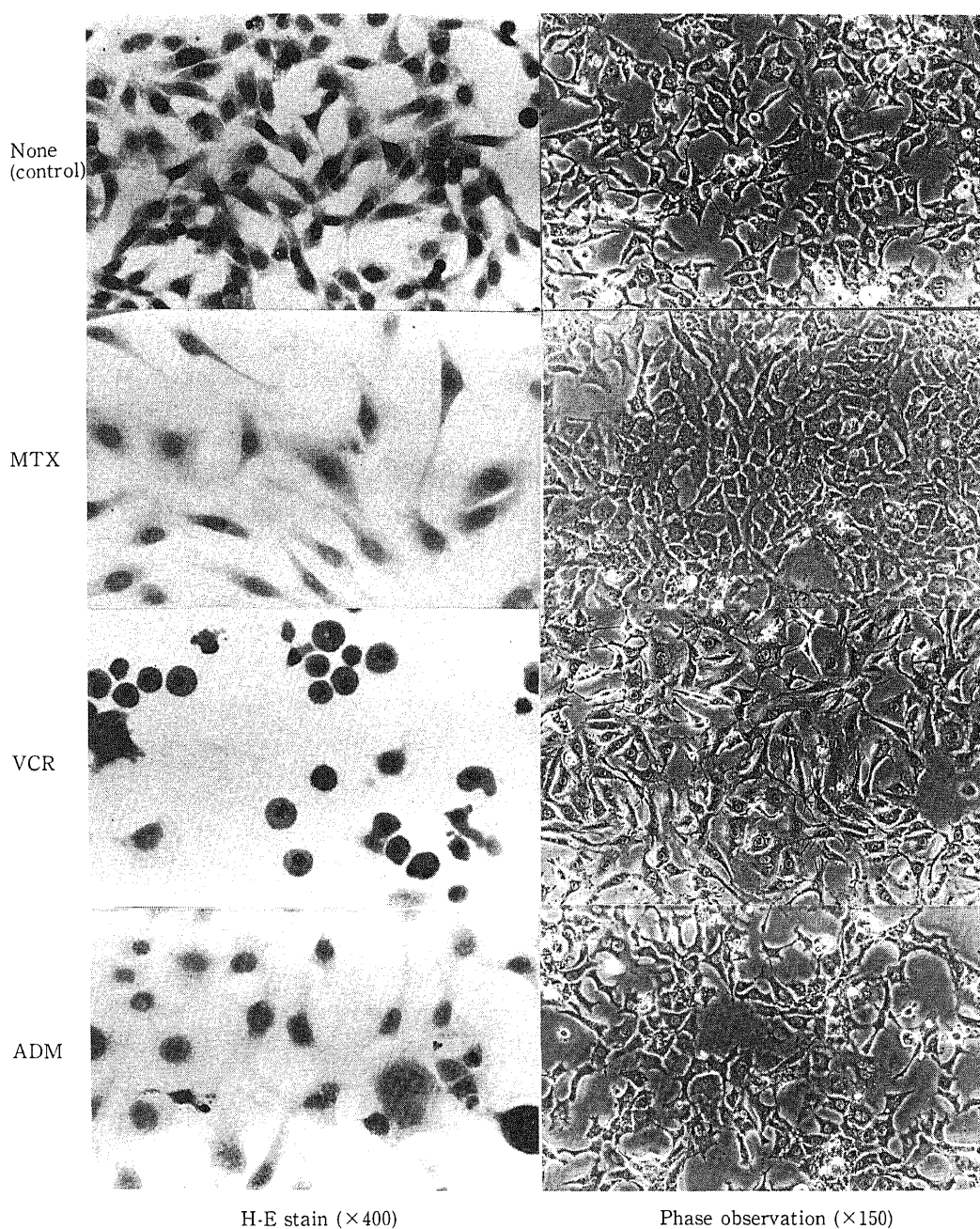


Photo 1. Microscopical findings of OST cell line treated in vitro with MTX, VCR and ADM in each*.

*Photographed immediately after removal of anticancer agent.

低濃度の場合、薬剤除去後まもなく増殖がみられ、高濃度では除去 48 時間後から増殖傾向が認められた(図 3)。

3) 細胞像

VCR の高濃度のみならず、低濃度作用下でも、MI はそれぞれ 40%、25%と増加しており、多数の mitosis 様細胞が認められ、また核濃縮細胞の増加がみられた(写真 1)。

3. ADM

1) DNA ヒストグラム

ADM を高濃度で作用させた細胞の DNA ヒストグラムは、薬剤の除去直後に 3C の増加を示し、48 時間後には 4C 単峰性となり、96 時間後もほぼ同様のパターンがみられた。低濃度の ADM の作用下では、薬剤除去直後に 3C 及び 4C の増加がみられたが、48 時間後には 2C 及び 4C の 2 峰性パターンが示され、96 時間後も同様の経過であった(図 5)。

2) 生細胞数

ADM の高濃度作用下では、増殖抑制は著明であり、薬剤除去 24 時間後まで生細胞数の減少が認められ、96 時間後に至るまで増殖傾向はなかった。低濃度作用下

では、薬剤除去 24 時間後より増殖の傾向がみられたが、その増殖度はきわめて緩徐であった(図 3)。

3) 細胞像

ADM の高濃度及び低濃度作用下での MI は低下しており、形態学的には典型的な紡錘形の細胞像が著明でなくなり、核の膨化、巨大化した円形細胞が多数認められた(写真 1)。

III. 2 剤交替併用

1. 1) MTX → ADM 作用群

i) DNA ヒストグラム

薬剤除去直後の高濃度作用群では、3C の上昇、4C の低下が、また低濃度群では 4C 単峰性のパターンが示された。48 時間後には両群ともに 4C 単峰性となり、96 時間後に至るまで同様のパターンが認められ、ADM の作用効果が明らかに示された(図 6)。

ii) 生細胞数

高濃度、低濃度両作用群ともに薬剤の除去直後、著明な増殖抑制がみられ、96 時間後に至るまで生細胞数は減少し、ADM 単剤作用群よりつよい抑制効果が得られた(図 7)。

iii) 細胞像

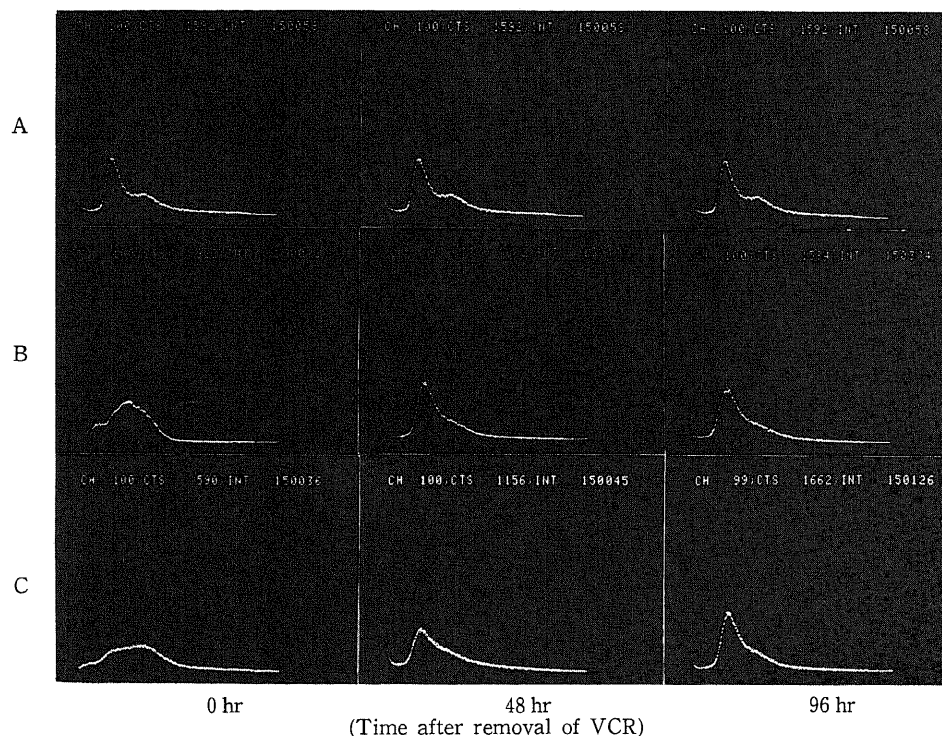


Fig. 4. DNA histograms of OST cell line treated with VCR *in vitro*.
A, no addition; B, low dose of VCR; C, high dose of VCR.

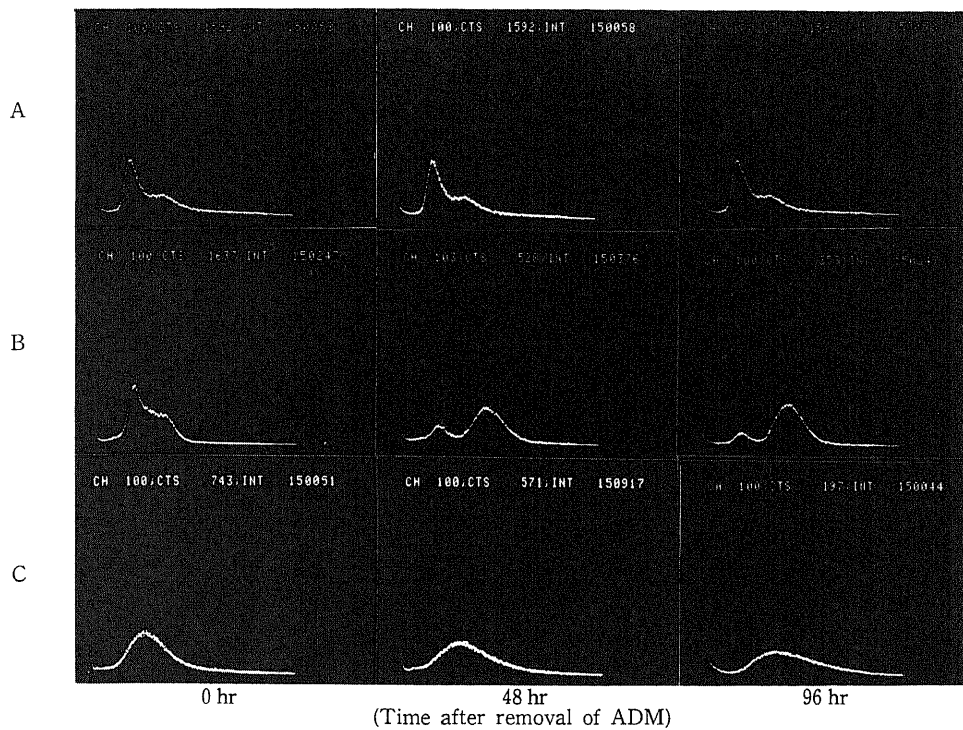


Fig. 5. DNA histograms of OST cell line treated with ADM *in vitro*.
A, no addition ; B, low dose of ADM ; C, high dose of ADM.

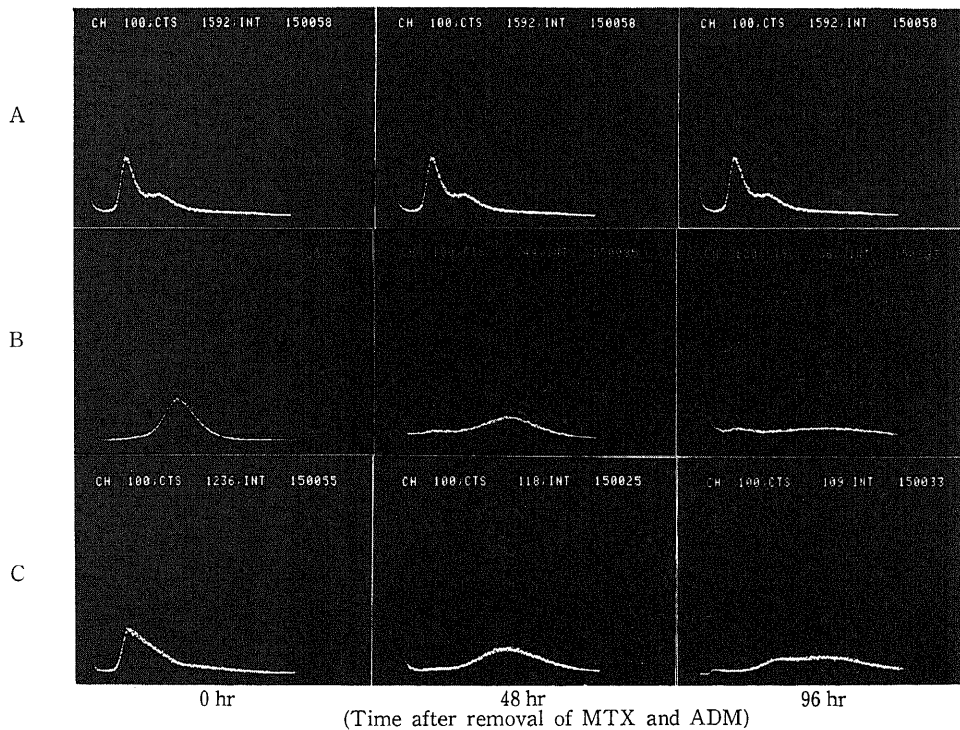


Fig. 6. DNA histograms of OST cell line after treatment with MTX, followed by ADM.
A, no addition ; B, low dose of MTX and ADM ; C, high dose of MTX and ADM.

核の大型化, 細胞の膨化, 多核巨細胞の増加などが著明で, ADM の単剤作用と類似した細胞変性像がみられたが, その程度はよりつよく, 48 時間後には細胞の膨化変性はさらに強度となった (写真 2).

1. 2) ADM → MTX 作用群

i) DNA ヒストグラム

高濃度, 低濃度作用群ともに薬剤除去直後 4C 単峰

性のパターンがみられ, 高濃度作用群では 96 時間後まで 4C 単峰性であったのに対し, 低濃度群では 96 時間後には 2C と 4C の 2 峰性パターンが認められた (図 8).

ii) 生細胞数

増殖抑制効果は ADM 単剤作用の場合と大差なく, 後に添加された MTX による抑制効果はほとんど認

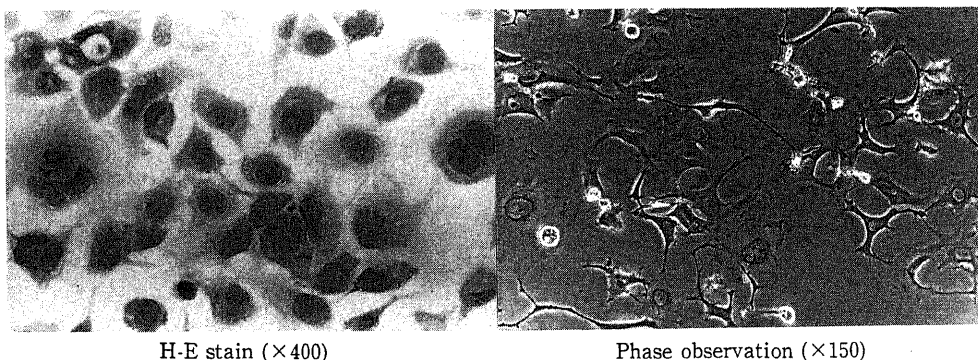


Photo 2. Microscopical findings of OST cell line after treatment with MTX, followed by ADM in vitro*.

*Photographed immediately after removal of anticancer agents.

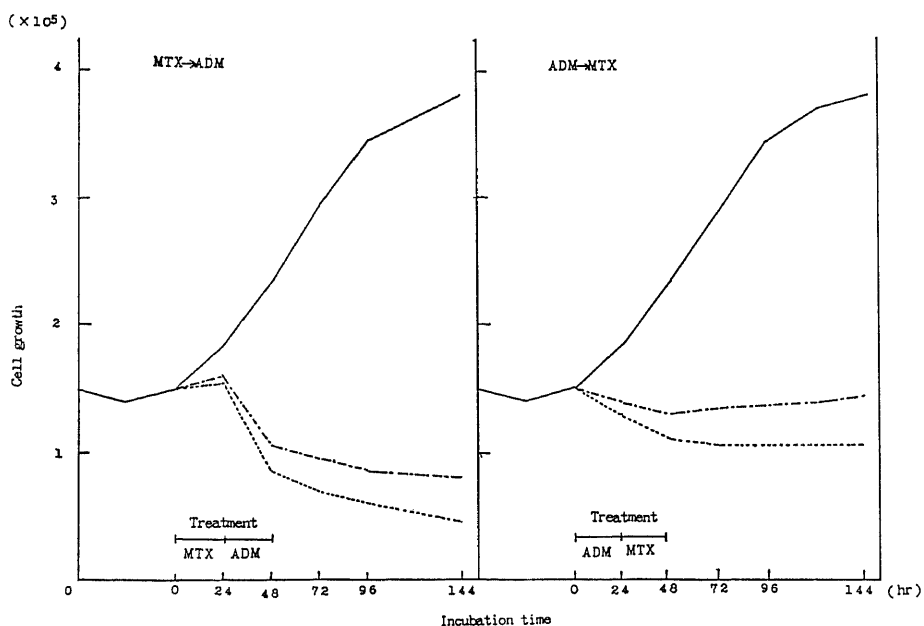


Fig. 7. Growth in culture of OST cell line after treatment with MTX and ADM. (—, none; ---, low dose; ·····, high dose)

められなかった (図 7)。

iii) 細胞像

MI は ADM 単剤作用時とほぼ同値であり、細胞像でも核の大型化、細胞の膨化などがみられ、ADM 単独による変性像に類似していた (データ省略)。

2.1) VCR → MTX 作用群

i) DNA ヒストグラム

薬剤除去直後には両濃度群ともに 4C の減少、3C の増加が出現し、高濃度群では、48 時間後まで 3C の増加は続いたが、96 時間後には対照群同様のヒストグラムを示した。低濃度群では 48 時間後に 4C の軽度の増加を認めたが、96 時間後には対照群に近いパターンに復した (図 9)。

ii) 生細胞数

両濃度群ともに薬剤除去直後から軽度の増殖はみられたが、VCR 単剤作用群より増殖速度はやや緩徐であった (図 10)。

iii) 細胞像

MI はわずかに増加しており、mitosis 様の細胞と核濃縮細胞が混在する像がみられた (データ省略)。

2.2) MTX → VCR 作用群

i) DNA ヒストグラム

高濃度作用群では、薬剤除去直後 3C の増加が認められ、24 時間後には 2C 及び 4C からなる低い 2 峰性パターンとなり、48 時間後には 2C のピークの外に、4C から 8C に及ぶ扁平化したピークをもつパターンとなった。しかし、96 時間後に対照群のヒストグラムに近い 2 峰性パターンに回復する傾向がみられた。低濃度作用群では、薬剤除去直後 2C 及びやや増加した 4C の 2 峰性パターンであったが、時間の経過とともに 4C は減少し、対照群のそれに近くなった (図 11)。

ii) 生細胞数

薬剤除去直後増殖抑制は著明であり、その後も徐々に細胞数の減少がみられ、96 時間後にも増殖傾向は認められなかった。MTX 及び VCR の単剤作用時に比べ、増殖抑制効果は明らかに優れていた (図 10)。

iii) 細胞像

MI は 20% と著明に高く、VCR 作用時にみられた mitosis 様の細胞が多数認められた。また、位相差顕微鏡による観察では、異常な突起を有し大きさを異にす

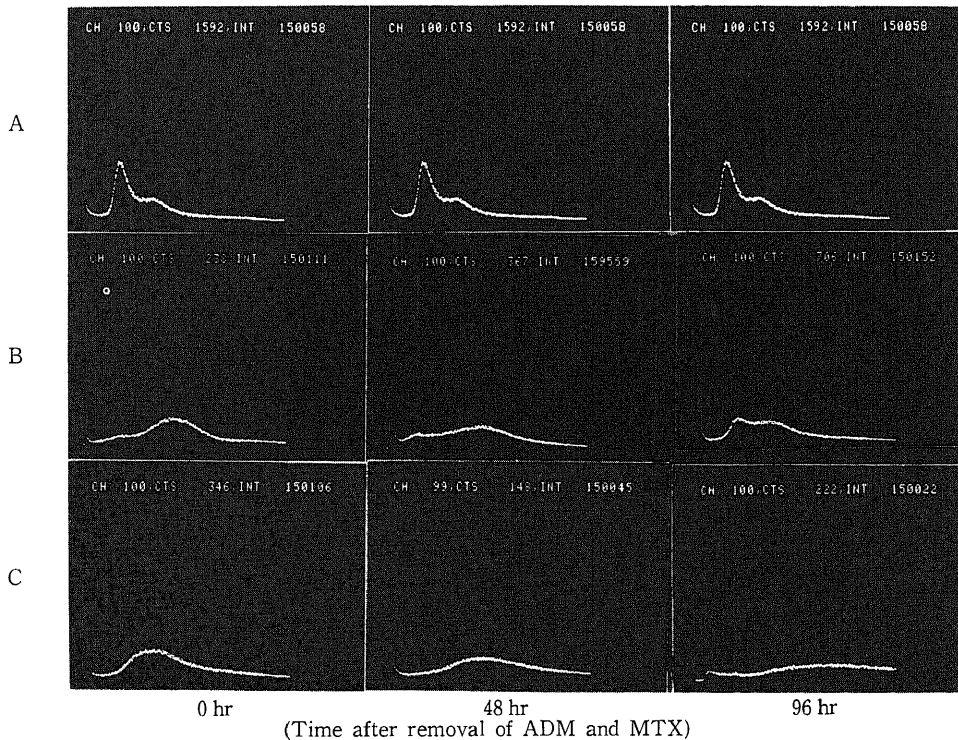


Fig. 8. DNA histograms of OST cell line after treatment with ADM, followed by MTX.

A, no addition; B, low dose of ADM and MTX; C, high dose of ADM and MTX.

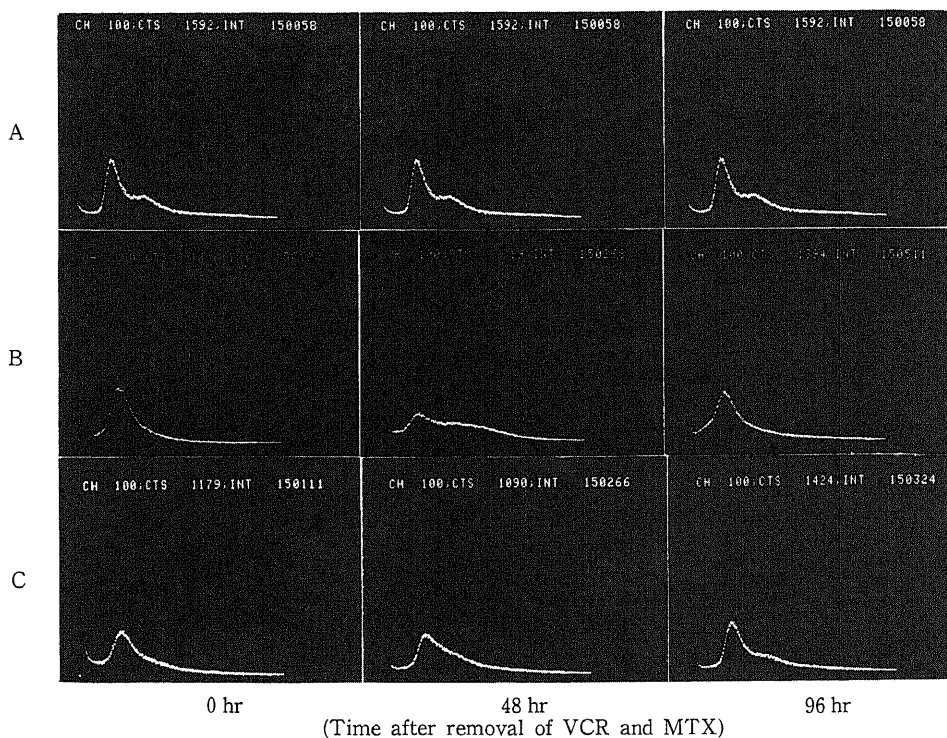


Fig. 9. DNA histograms of OST cell line after treatment with VCR, followed by MTX. A, no addition; B, low dose of VCR and MTX; C, high dose of VCR and MTX.

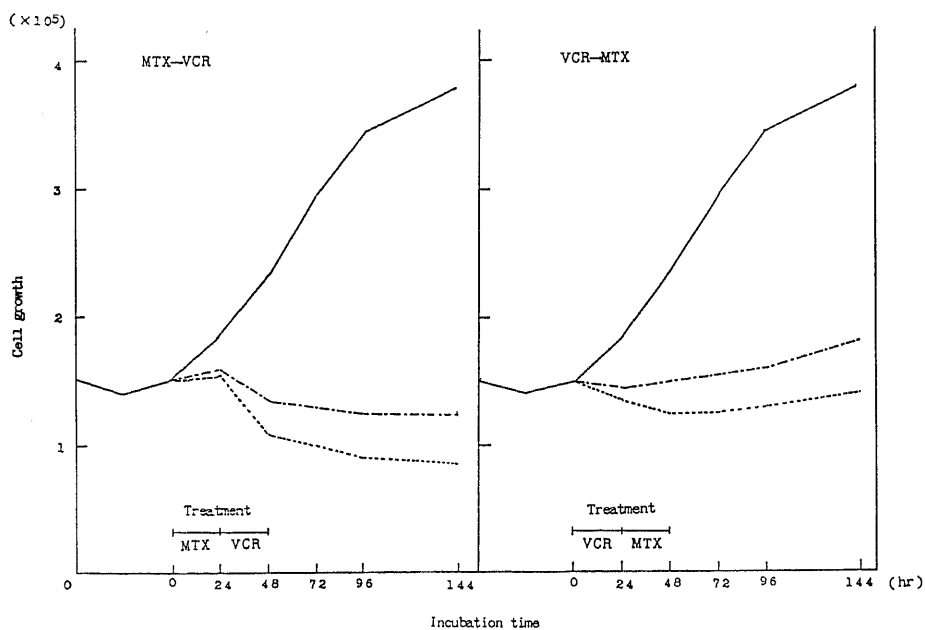


Fig. 10. Growth in culture of OST cell line after treatment with VCR and MTX. (—, none; ---, low dose; ····, high dose)

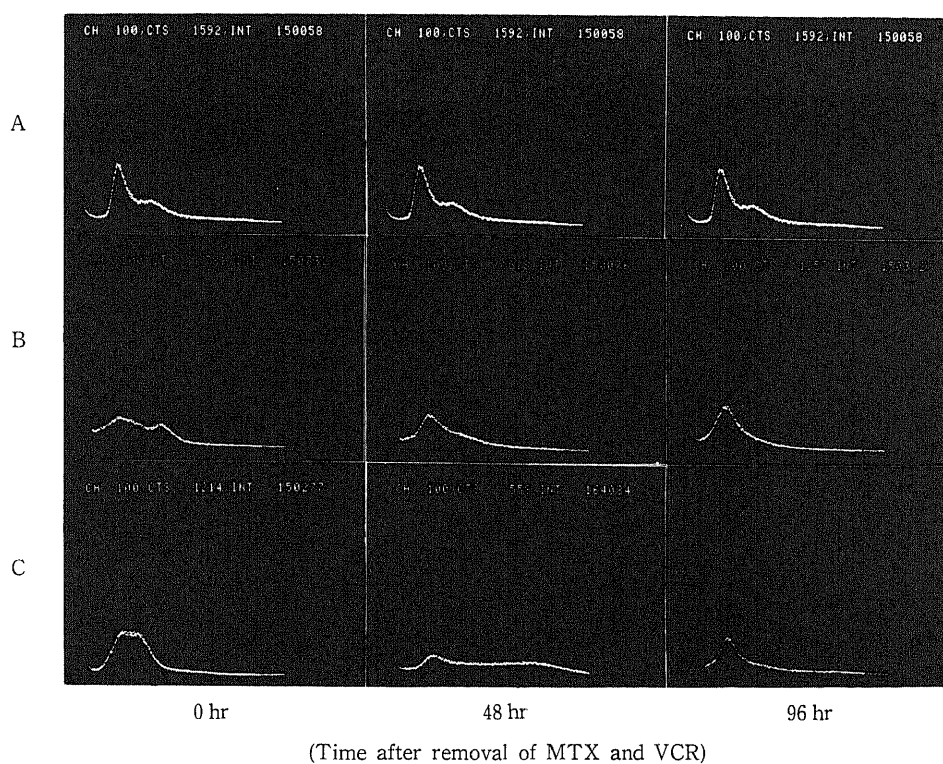


Fig. 11. DNA histograms of OST cell line after treatment with MTX, followed by VCR.
A, no addition; B, low dose of MTX and VCR; C, high dose of MTX and VCR.

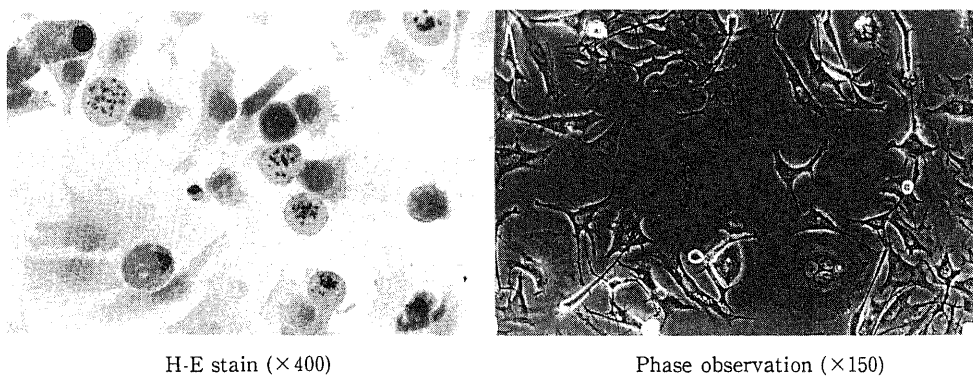


Photo 3. Microscopical findings of OST cell line after treatment with MTX, followed by VCR in vitro*

*Photographed immediately after removal of anticancer agents.

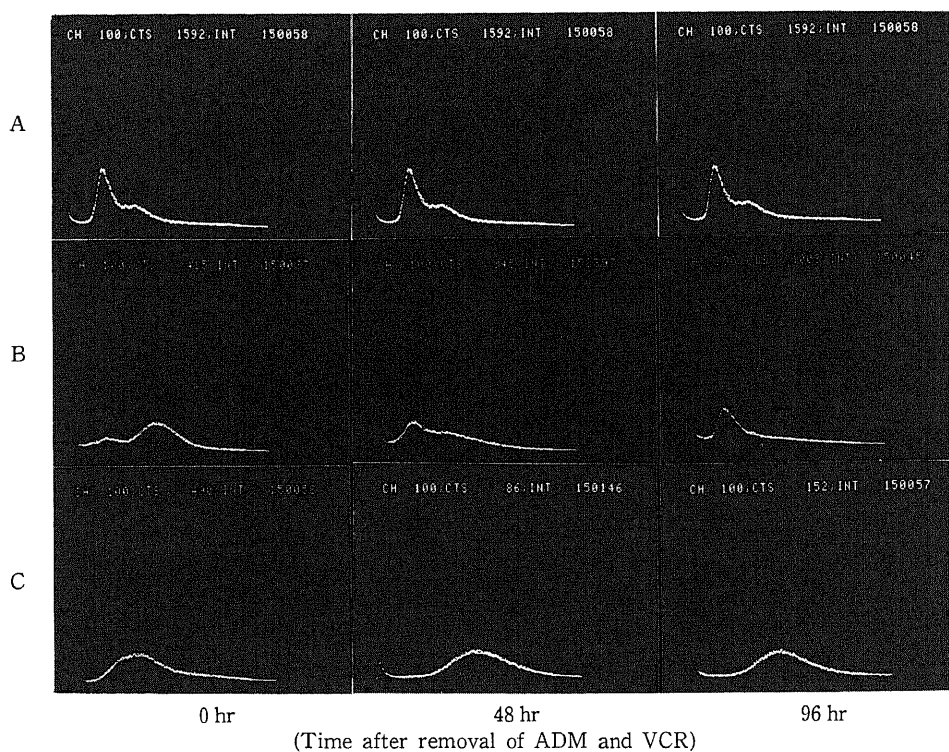


Fig. 12. DNA histograms of OST cell line after treatment with ADM, followed by VCR.
A, no addition; B, low dose of ADM and VCR; C, high dose of ADM and VCR.

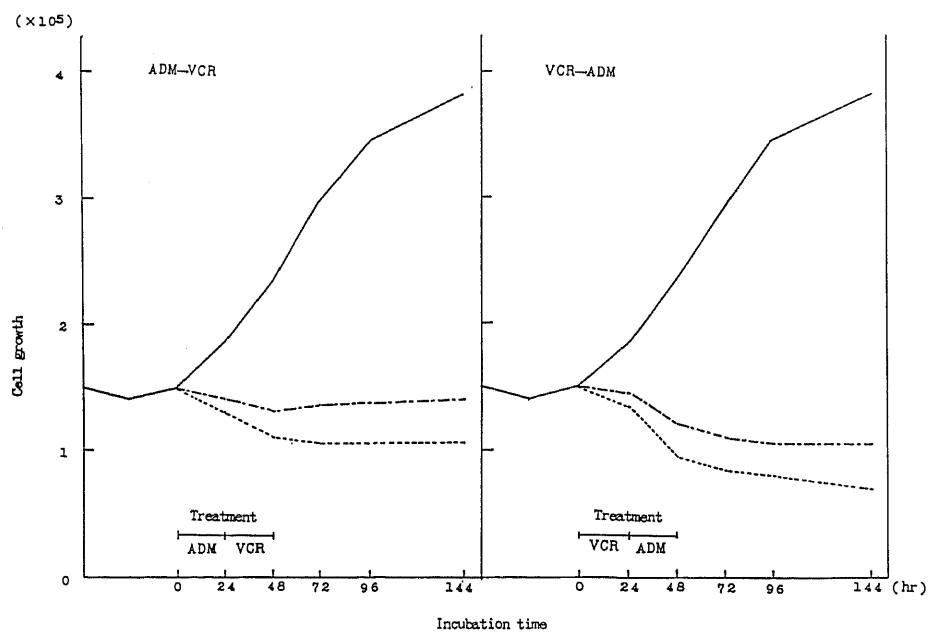


Fig. 13. Growth in culture of OST cell line after treatment with ADM and VCR.
(—, none; ---, low dose; ····, high dose).

る多核巨細胞の出現が認められた (写真 3)。

3. 1) ADM → VCR 作用群

i) DNA ヒストグラム

高濃度作用群では、薬剤除去直後から 96 時間後に至るまで 4C 単峰性パターンを呈し、ADM の作用効果を示すヒストグラムであった。また、低濃度群では薬剤除去後時間の経過とともに 4C は減少し 2C が増加する傾向がみられた (図 12)。

ii) 生細胞数

両濃度群ともに、ADM 単剤作用における増殖抑制効果とほぼ同様であり、VCR による効果はほとんど認められなかった (図 13)。

iii) 細胞像

ほとんどの細胞に核の大型化、細胞の円形化などの変化が認められたが、mitosis 様の細胞はきわめて少なかった (データ省略)。

3. 2) VCR → ADM 作用群

i) DNA ヒストグラム

薬剤除去直後は高低両濃度作用群ともに、2C が減少し 4C が増加する 2 峰性パターンがみられ、VCR 及び ADM 両剤の効果が示唆された。しかし、除去 48 時間

後より 96 時間後まで、扁平化はしているが 4C の増加はひきつづき認められ、ADM 作用効果を示すヒストグラムがみられた (図 14)。

ii) 生細胞数

薬剤除去直後にみられた著明な増殖抑制は、96 時間後まで継続しており、VCR 及び ADM をそれぞれ単独に作用させた場合に比較し、増殖抑制効果ははるかに優れていた (図 13)。

iii) 細胞像

MI は高濃度作用群で 6 %、低濃度群で 4 % と軽度には上昇していた。細胞像所見では、VCR の作用とみられる mitosis 様細胞の出現と、ADM の作用と思われる巨大核細胞の出現が著明であった (写真 4)。

IV. 3 剤交替併用

MTX → VCR → ADM のように 3 剤を順次作用させた場合に、もっとも著明な増殖抑制効果が得られた。

1. DNA ヒストグラム

3 種の抗癌剤をそれぞれ高濃度及び低濃度に組み合わせて作用させた場合、両群ともに薬剤除去直後から 96 時間後に至るまで 4C 単峰性のパターンを示し、ADM の高濃度作用のヒストグラムとほぼ同様であっ

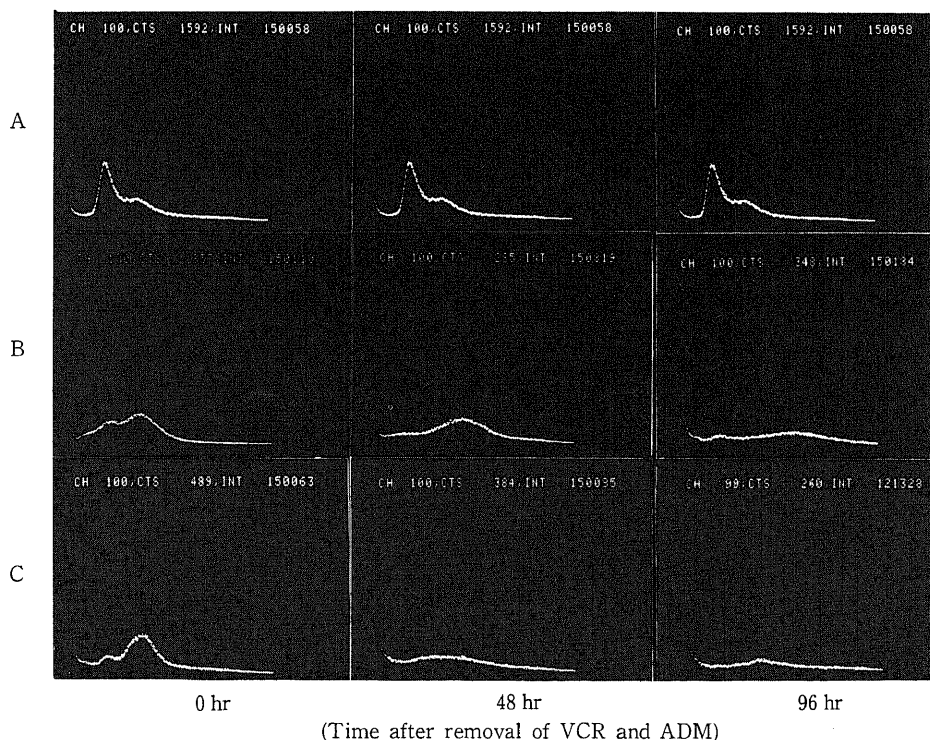


Fig. 14. DNA histograms of OST cell line after treatment with VCR, followed by ADM.

A, no addition; B, low dose of VCR and ADM; C, high dose of VCR and ADM.

た (図 15).

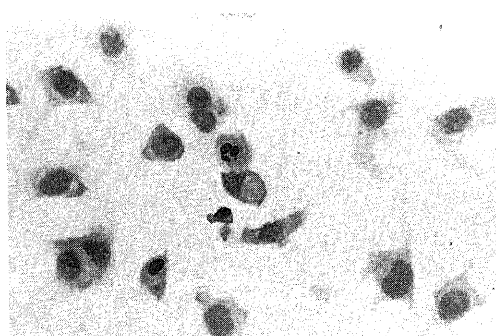
2. 生細胞数

MTX, VCR 及び ADM の三者三様の組み合わせにおける細胞増殖の抑制効果はきわめて強く, 96 時間後

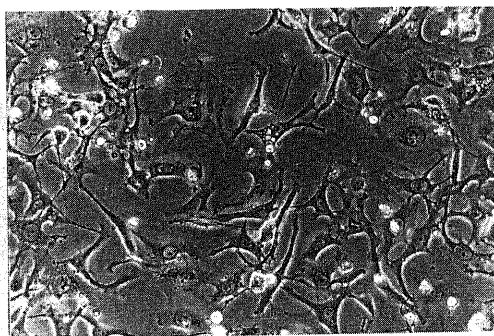
においてもなお著明な抑制が見られた (図 16).

3. 細胞像

VCR の作用後にみられる mitosis 様細胞と ADM の作用によると思われる核の大型化した細胞の出現が



H-E stain ($\times 400$)



Phase observation ($\times 150$)

Photo 4. Microscopical findings of OST cell line after treatment with VCR, followed by ADM in vitro*.

*Photographed immediately after removal of anticancer agents.

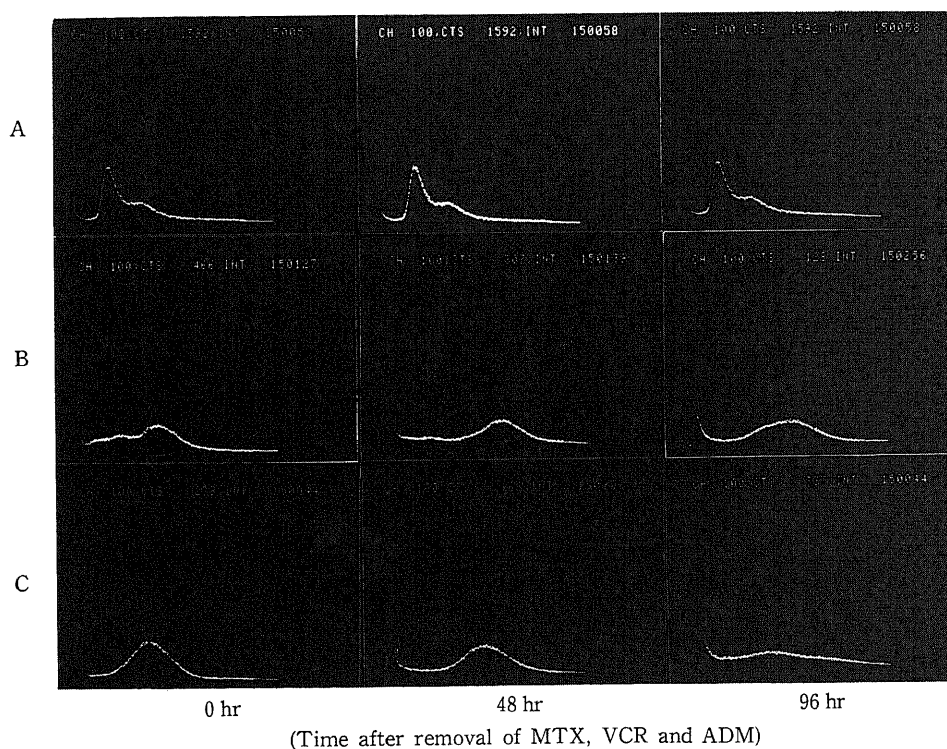


Fig. 15. DNA histograms of OST cell line after treatment with MTX, VCR and ADM in order.

A, no addition; B, low dose of MTX, VCR and ADM; C, high dose of MTX, VCR and ADM.

著明であり、正常の OST 株細胞におけるような円形の核をもつ紡錘形の細胞はほとんど認められなかった (写真 5)。

考 察

本研究は骨肉腫に対する多剤併用療法において、抗

癌剤の選択、投与計画とくに各抗癌剤の投与順序が、抗腫瘍効果発現に多大の影響を及ぼすことが考えられるところから、最大の効果を得るための条件を、細胞回転の面から解析する目的で行なった。

I. OST 株細胞の増殖動態

まず DNA ヒストグラムについてみると培養直後で

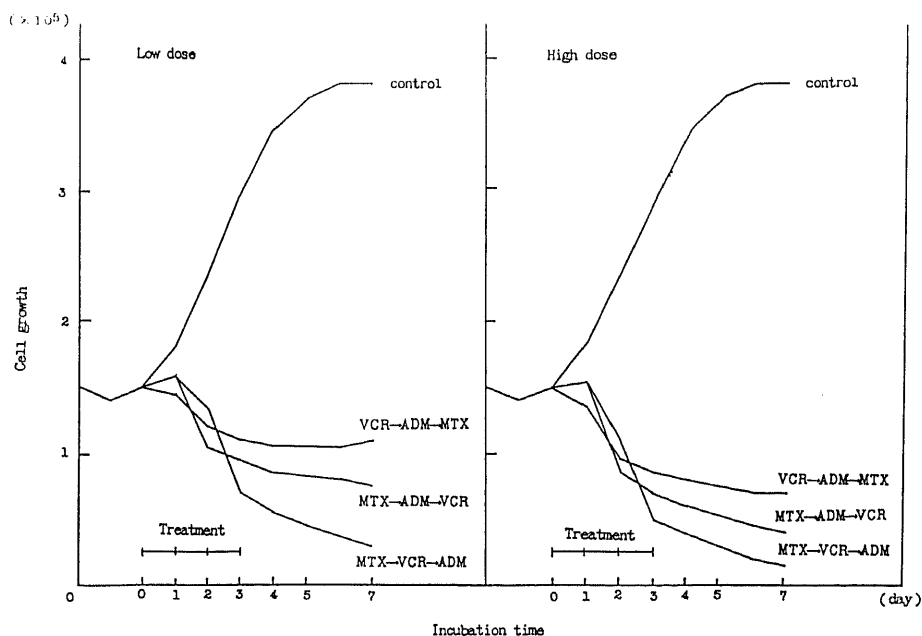
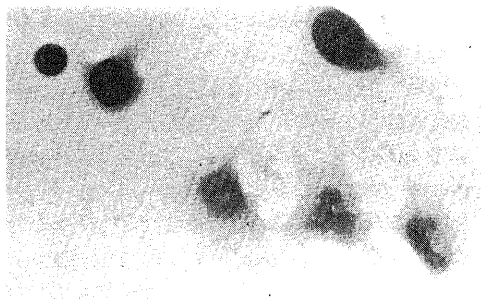
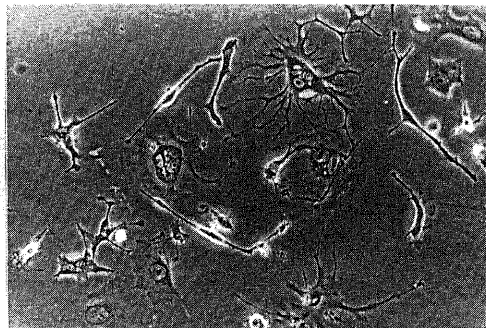


Fig. 16. Growth in culture of OST cell line after treatment with various combination of MTX, VCR and ADM.



H-E stain (×400)



Phase observation (×150)

Photo 5. Microscopical findings of OST cell line after treatment with MTX, VCR and ADM in order*.

*Photographed immediately after removal of anticancer agents.

は2C単峰性であったが、対数増殖期の細胞集団では2Cと4Cの2峰性パターンを呈した。渡部³⁸⁾は、正常の末梢血リンパ球のDNAヒストグラムでは、2C単峰性のパターンを示すが、リンパ性白血病では、末梢血中に増殖しつつあるリンパ球が多数出現し、3C及び4C、すなわちS期及び(G2+M)期の細胞の比率が著しく増加し、2Cに大きく4Cに小さい2峰性のDNAヒストグラムを示すと述べている。このことからみるとOST株細胞も増殖相にある細胞集団を中心とした悪性腫瘍であることが支持される。

II. 抗癌剤単独作用下でのOST株細胞の増殖動態

葉酸拮抗物質MTXは、葉酸から4水素葉酸への還元を抑制することによって、チミン及びプリンの生合成阻害をきたし、その結果DNA合成が阻害されることが知られている³⁹⁾。Skipperら⁴⁰⁾は、MTXは細胞回転上S期にもっとも感受性が高いが、DNA合成のほかRNA、蛋白合成をも阻害しG1期、G2期、M期にも作用し、細胞周期全体の進行遅延をきたすことを指摘し、MTXを長時間作用させると、S期に入る細胞が漸次減少し、殺細胞効果が減弱することから、この薬剤はS phase specific with self limitationに属するものと分類している。細胞回転の進行に関してWheelerら⁴¹⁾は、MTXにおいてG₁-S移行期でpartial synchronizationが観察されたと報告している。

著者の実験でも、(G2+M)期の減少、S期の増加は認められたが、DNAヒストグラムでみる限り、おもに2C単峰性パターンを示し、S期よりもG₁-S移行期に細胞の蓄積をきたすものと思われ、この点Tobeyら²⁷⁾の報告に一致していた。また、生細胞数について薬剤除去後すみやかに増殖がみられたことは、G₁-S移行期での阻害が解除され、S期へ進行したためと思われる。

すなわち、臨床上Lampkinら¹⁶⁾、Ernstら¹⁷⁾が観察しているように、MTXはOST株細胞に対し同調化作用を有するものと思われた。

VCRの作用機序については、なお不明の点があるが、Creasey⁴²⁾は、可逆的な分裂中期停止作用と、DNA依存性RNA polymerase阻害によるRNA合成阻害の二つの作用特性があることを実証し報告している。

VCRは従来からphase specificな薬剤とされており¹³⁾、Madoc-Jonesら⁴³⁾はとくにS期に感受性が高いと報告している。細胞回転では、S期で細胞が感作されてもG2期及びM期まで進行し、その結果不可逆的なmetaphase arrestをおこすといわれている⁴³⁾⁴⁴⁾。

本実験におけるDNAヒストグラムでも3C及び4C、おもに4Cの増加が認められ、また分裂期細胞が増加し、metaphase arrestを示唆する細胞像所見が得ら

れている。しかし、生細胞数では、薬剤除去後速やかに増殖が開始することより、OST株細胞に対するVCRによるmetaphase arrest効果は可逆的である可能性も考えられる。

ADMはanthracycline系の抗生物質であり、DNAと結合し、DNA依存性のRNA及びDNA合成を阻害することによって効果を発揮するとされている⁴⁵⁾。

Kimら⁴⁶⁾は、標的細胞のage response curveから検討し、S期がもっとも感受性が高いと述べており、Barrancoら⁴⁷⁾はとくにearly S期に高く、late S期では低いと報告している。

ADMの細胞回転への影響についてはKrishanら²⁵⁾が報告しているように、著者の実験でも、細胞回転の進行停止をおこす有効濃度よりも低い濃度で(G2+M)期の蓄積がみられた。さらに細胞像所見では、MIが低値であったことから、DNAヒストグラムにみられた4Cの細胞集団は、そのほとんどがG2期に存在したものと思われる。

また高濃度作用下で、96時間後においても4Cの増加が継続していることは、Barlogieら⁴⁸⁾、太田ら⁴⁹⁾の報告のように、不可逆的なG2期細胞の蓄積をきたした可能性もあると思われる。

III. 2剤交替併用

1. MTX, ADM 2剤交替併用

MTXを作用させた後にADMを作用させた群のDNAヒストグラムでは、4Cの増加が96時間後まで続き、細胞像では分裂期細胞がきわめて少ないことからみて、ADMの作用特性であるG2期阻害によることが示唆された。

しかし、生細胞数についてみると、ADM単剤作用に比較して強い増殖抑制効果が認められたことから、この薬剤処理順序では、MTXとADMによる相乗効果が得られたものと判断された。相乗効果が得られた理由としては、MTXがsynchronizing agentとして作用したことが考えられる。

太田ら⁴⁹⁾はin vitroにおいてMTXの細胞周期に及ぼす影響をFCMによって検討し、S期にpartial synchronizationをおこす機序について、S期の延長作用とG₁-S移行期での阻害解除の2つの可能性を示唆している。

平井⁵⁰⁾によるMTX単剤作用の結果でも、G₁-S移行期で細胞蓄積をおこすことが示されている。換言すれば、MTX除去後G₁-S移行期に蓄積された細胞がS期に入り、partial synchronizationがおこり、そこでS期に特異な薬剤であるADMに感作されたため、高い相乗効果が得られたものと考えられた。

次に、ADM作用後に、MTXを作用させた群の

DNA ヒストグラムでは、ADM による G2 期阻害を示す所見が得られ、生細胞数でも ADM 単剤の効果と大差なく、細胞像所見でも MI が ADM 単剤のそれと同程度であったことからみて、MTX の作用効果はほとんど発現されなかったものと思われた。MTX は S phase specific with self limitation の薬剤に分類され、G1 期、G2 期及び M 期の細胞にも作用するが、もっとも効果を示すのは S 期の細胞に対してである。この投与順序では、最初に投与された ADM の作用によりほとんどの細胞が G2 期に蓄積されるため、MTX の作用効果が発現されなかったものと考えられた。

以上のことから、MTX と ADM の交替併用については MTX をさきに作用せしめて S 期での partial synchronization を誘導したのち、ADM を作用せしめるという順序が細胞回転からみて有効であると考えられた。

2. VCR, MTX 交替併用群

VCR を作用させた後に MTX を作用させた群の DNA ヒストグラムでは、高濃度及び低濃度作用群ともに、薬剤除去直後 4C の減少、3C の増加が認められた。これは VCR により metaphase arrest をおこした細胞が死に陥ったこと、そして MTX による G1-S 移行率の減少によるものと思われた。また、低濃度作用群では、除去 48 時間後に (G2+M) 期細胞の増加が認められたが、これは MTX の作用解除後、S 期に partial synchronization をおこした細胞が徐々に細胞回転上進行し (G2+M) 期に入ったためと思われた。

生細胞数でも増殖は緩徐であったが、これは MTX による G1-S 移行率の減少とともに、下山ら⁵¹⁾が指摘しているように、VCR 及び MTX が S 期のみでなく、G1 期、G2 期、M 期の細胞にも作用し、細胞回転の進行遅延をきたしたためと考えられた。

次に、MTX 作用後に、VCR を作用させた群の DNA ヒストグラムについてみると、高濃度作用群では薬剤除去直後に 3C が 24 時間後に 4C の増加が認められたが、これは後に作用させた VCR により、S 期の細胞が感作され、S 期は正常に進行するが M 期で影響を受け metaphase arrest をきたしたためと思われた。低濃度作用群でも、薬剤除去直後 4C の増加が認められたが、これは VCR による metaphase arrest を示唆するものとみられた。また、24 時間後に 4C の増加度が減少したが、生細胞数が減少傾向を示していることからみて、可逆的な metaphase arrest ではなく、細胞死の経過をとったものとみなされた。

高濃度作用群で、薬剤除去 48 時間後に 4C から 8C にかけて扁平化したヒストグラムが出現したが、太田ら⁴⁹⁾の述べる VCR による不均等な核分裂作用が起

こった結果であると思われる。細胞像所見でも、時間の経過とともに多核細胞など種々の形態の異常細胞が出現しており、DNA ヒストグラムと関連しているものと思われた。以上 DNA ヒストグラムでは、後に作用させた VCR の作用効果が明らかに認められ、生細胞数では除去直後著明な増殖抑制が認められたことから、MTX → ADM 作用群について述べたように、MTX により S 期に partial synchronization された細胞が S 期に特異な薬剤である VCR に感作されたため、相乗効果が得られたと考えられた。さらにまた、生細胞数で増殖開始遅延の傾向が認められたが、これは VCR → MTX 作用群で述べたように、MTX 及び VCR による細胞回転進行遅延によるものと考えられた。

以上 MTX と VCR の組み合わせでは、いずれの作用順序でも薬剤効果は相殺されないが、MTX を先に作用させ、S 期での partial synchronization を起こさせたのち、S 期に最も感受性を示す VCR を作用させるという順序のほうが、有利であるとみられた。

3. ADM, VCR 交替併用群

ADM を作用後に VCR を作用させた群の DNA ヒストグラムは、高濃度作用群において ADM 単剤作用と同様のパターンを示し、生細胞数でも ADM 単剤作用のそれとほとんど差異がなかったことからみると、VCR の作用効果は発現されなかったものと考えられる。また、低濃度作用群では、薬剤除去直後にみられた 4C の増加が時間の経過とともに減少し、これが ADM による G2 期阻害によるものか、VCR による metaphase arrest によるものかは判断し兼ねるが、生細胞数では増殖抑制が ADM 単剤による効果と大差なく、細胞像所見でも mitosis 様細胞が非常に少なかったことからみて、高濃度作用群同様に VCR の作用効果は発現されなかったと考えられた。

すなわち、ADM の作用によってほとんどの細胞が G2 期に集積され、VCR がもっとも強い殺細胞効果を発揮する S 期の細胞が極度に減少したため、結局 VCR の作用発現がなかったと推察される。

次に、VCR を作用後 ADM を作用させた群の DNA ヒストグラムでは、両濃度群ともに薬剤除去直後 2C に低く、4C に高いピークを有する 2 峰性パターンがみられた。生細胞数では、VCR 単剤では得られない程強い増殖抑制が示され、細胞像所見で mitosis 様細胞と核の大型化した細胞が出現していたことなどから、VCR, ADM 両薬剤の作用効果が相乗的にあらわれたものと考えられた。すなわち、4C に存在する細胞は、VCR により metaphase arrest をおこした細胞と、ADM による G2 期阻害をおこした細胞の集団であると推察される。

以上のことから、VCR → ADM 作用群では、VCR の作用により metaphase arrest をおこした細胞は死に至るが、VCR の作用効果の1つとして下山ら⁵¹⁾が報告しているように、細胞回転の遅延をきたし、そのために VCR の殺細胞効果をうけずに生存した細胞が S 期に移行し、その後の時点で ADM の作用をうけたものと考えられ、この薬剤処理順序では両薬剤の効果は相殺されなかったものと思われた。

従って、VCR と ADM を 2 剤交替併用する場合、VCR による効果を期待するためには、ADM を先に作用させるよりも、むしろ VCR 作用後に ADM を作用させるスケジュールが望ましいと考えられた。

IV. 3 剤交替併用

DNA ヒストグラムでは MTX, VCR, ADM の作用順序において、両濃度群ともに 4C 単峰性パターンが薬剤除去直後から 96 時間後においても観察され、最後に作用させた ADM によって、不可逆的な G2 期阻害がおこったことが示唆された。また、生細胞数については、MTX → VCR → ADM の順序でもっとも強い増殖抑制効果が得られており、MTX → ADM → VCR の順序で作用させた群では、ADM の作用によってほとんどの細胞が G2 期に蓄積されるため、S 期特異の薬剤である VCR の作用効果が発現されず、また VCR → ADM → MTX の順序で作用させた群でも、ADM の後に作用せしめた MTX の作用が発現されなかったものと思われた。

これに対し、MTX → VCR → ADM の順序による作用群では、MTX により S 期に synchronization された細胞に VCR が作用し、その結果として metaphase arrest が誘導され、殺細胞効果が得られたものと思われた。さらに生存しえた細胞が S 期まで進行したとしても、S 期において ADM の作用をうけることになり、顕著な増殖抑制効果が得られたわけである。

現在、臨床では ADM 投与後数日の間隔をおき、VCR, MTX を投与する方法が一般に行なわれているが、今回 OST 株に対する 3 剤交替併用が細胞周期に及ぼす影響を検討したところ、MTX は synchronizing agent として作用するため、MTX → VCR → ADM の順序で投与するほうが、細胞回転の立場からみて、最も有効な殺細胞効果が得られると考えられた。

結 論

臨床上、骨肉腫の多剤併用療法に使用されている MTX, VCR 及び ADM 3 剤の至適投与順序を細胞回転の立場から研究した。すなわち、ヒト骨肉腫細胞 OST 株を対象とする培養系を用い、これら 3 種の抗癌剤を単独あるいは複数に組み合わせて作用させた場合

の細胞回転動態を、FCM によって解析すると同時に、生細胞数、分裂期細胞数の測定並びに、細胞形態変化の観察を行ない、次の結論を得た。

1. MTX は OST 細胞を S 期に同調、集積させるところから、これを VCR, ADM に先行して作用させるほうが有利である。

2. ADM はその作用濃度の高低にかかわらず、ほとんどの細胞を G2 期に集積させるために、ADM → MTX, あるいは ADM → VCR の併用順序では、DNA ヒストグラムと殺細胞効果でみる限り、ADM の単独作用とほとんど差異がなく、MTX, VCR の効果は発現されなかった。従って ADM は他剤作用後に使用するほうが良いと思われる。

3. VCR の単独作用では、metaphase arrest による MI の増加がみられたが、他剤との併用では、VCR を先に作用させると、metaphase arrest の誘導はみられなかった。従って細胞集団をまず S 期に同調集積させて、次いで VCR を作用させる MTX → VCR の組み合わせ順序が最良と思われる。

4. 3 剤交替併用では、MTX → VCR → ADM の組み合わせで最大の増殖抑制効果が得られ、細胞回転からみても、合理的な投与スケジュールとみなされた。

以上、多剤併用作用では、細胞回転の観点からみて、抗癌剤の投与順序が殺細胞効果をうることに、大きく影響を及ぼしていることを証明した。

謝 辞

稿を終えるに臨み、御指導、御校閲を賜りました恩師野村進教授に深甚の謝意を表します。また、本研究を当初より御指導、御教示頂きました富田勝郎助教授に心から謝意を表します。

文 献

- 1) 富田勝郎・野村 進・島 巖・宗広忠平・中村 孝・野村忠雄・山田義夫・清水俊治・千葉英史・林 正岳・横川明男・松原藤継・樋口雅章・杉木繁隆：原発性骨肉腫およびその肺転移巣に対する methotrexate-citrovorum factor 大量療法の概容とその評価。整形外科, 32, 1019-1028 (1981).
- 2) Finklestein, J. Z., Hittle, R. E. & Hammond, G. D.: Evaluation of a high dose cyclophosphamide regimen in childhood tumors. Cancer, 26, 1239-1242 (1969).
- 3) Sullivan, M. P. & Sutow, W. W.: L-Phenylalanine mustard as a treatment for metastatic osteogenic sarcoma in children. J. Pediatr., 63, 227-237 (1963).

- 4) Frank, W. & Osterberg, A.: Mitomycin C (NSC-26980). Clinical brochure. Cancer Chemother. Rep., 55, 285-291 (1971).
- 5) Sutow, W. W., Vietti, T. J., Fernbach, D. J., Lan, D. M., Donaldson, M. H. & Lonsdale, D.: Evaluation of chemotherapy in children with metastatic Ewing's sarcoma and osteogenic sarcoma. Cancer Chemother. Rep., 55, 67-78 (1971).
- 6) Wang, J. J., Cortes, E., Sinks, L. F. & Holland, J. F.: Therapeutic effect and toxicity of adriamycin in patients with neoplastic disease. Cancer, 28, 837-843 (1971).
- 7) Jaffe, N. & Paed, M. D.: Recent advances in the chemotherapy of metastatic osteogenic sarcoma. Cancer, 30, 1627-1631 (1972).
- 8) Djerassi, I.: High-dose methotrexate (NSC-740) and citrovorum factor (NSC-3590) rescue: Background and rationale. Cancer Chemother. Rep. Part3, 6, 3-6 (1975).
- 9) Fyfe, M. J. & Goldman, I. D.: Characteristics of the vincristine-induced augmentation of methotrexate uptake in Ehrlich ascites tumor cells. J. Biol. Chem., 248, 5067-5073 (1973).
- 10) Rosen, G., Suwansirikul, S., Kwon, C., Tan, C., Wu, S. J., Beattie, E. J. & Murphy, M. L.: High dose methotrexate with citrovorum factor rescue and adriamycin in childhood osteogenic sarcoma. Cancer, 33, 1151-1163 (1974).
- 11) Jaffe, N., Frei, E., Traggis, D., Cassady, J. R., Watts, H. & Filler, R. M.: High dose methotrexate with citrovorum factor in osteogenic sarcoma-progress report II. Cancer Treat. Rep., 61, 675-679 (1977).
- 12) 富田勝郎・野村 進・林 正岳・平井 純・紺谷 悌二・三平伸一・横川明男・渡辺洋宇・松原藤継・北川正信: 骨軟部悪性腫瘍肺転移巣に対して外科的治療を行なった9例の検討. 整形外科投稿中
- 13) Bruce, W. R., Meeker, B. E. & Valeriote, F. A.: Comparison of the sensitivity of normal hematopoietic and transplanted lymphoma colony-forming cells to chemotherapeutic agents administered in vivo. J. Nat. Cancer Inst., 37, 233-245 (1966).
- 14) Sinclair, W. K.: Hydroxyurea. Effects on Chinese hamster cells growth in culture. Cancer Res., 27, 297-308 (1967).
- 15) Wheeler, G. P., Bowdon, B. J., Adamson, D. J. & Vail, M. H.: Effects of certain nitrogen mustards upon the progression of cultured H. Ep. No.2 cells through the cell cycle. Cancer Res., 30, 100-111 (1970).
- 16) Lampkin, B. C., McWilliams, N. B. & Mauer, A. M.: Cell kinetics and chemotherapy in acute leukemia. Semin. Hematol., 9, 211-223 (1972).
- 17) Ernst, P. & Killmann, S. A.: Perturbation of generation cycle of human leukemic myeloblasts in vivo by methotrexate. Blood, 38, 689-705 (1971).
- 18) Burke, P. J. & Owens, A. H. Jr.: Attempted recruitment of leukemic myeloblasts to proliferative activity by sequential drug treatment. Cancer, 28, 830-836 (1971).
- 19) Pouillart, P., Weiner, R., Misset, J. L. & Schwarzenberg, L.: Combination chemotherapy based on a model of recruitment by partial synchronization. Proc. Am. Assoc. Cancer Res., 14, 115 (1973).
- 20) Kremer, W. B., Vogler, W. R. & Cran, Y. K.: An attempt at synchronization of marrow cells in acute leukemia. Relationship to therapeutic response. Cancer, 37, 390-403 (1976).
- 21) Constanzzi, J.: Bleomycin infusion as a potential synchronizing agent in carcinoma of the head and neck. Am. Assoc. Cancer Res., 17, 11 (1976).
- 22) Drewinko, B., Brown, B. W., Humphrey, R. & Alexanian, R.: Effect of chemotherapy on the labeling index of myeloma cells. Cancer, 34, 526-531 (1974).
- 23) Tomita, K. & Plager, J. E.: In vivo cell cycle synchronization of the murine sarcoma 180 tumor following alternating periods of hydroxyurea blockade and release. Cancer Res., 39, 4407-4411 (1979).
- 24) Dilla, M. V., Trujillo, T. T., Mullancy, P. F. & Coulter, J. R.: Cell microfluorometry. A method for rapid fluorescence measurement. Science, 163, 1213-1214 (1968).
- 25) Krishan, A. & Frei, E.: Effect of adriamycin on the cell cycle traverse and kinetics of cultured human lymphoblasts. Cancer Res., 36, 143-150 (1976).
- 26) Yataganas, X. & Clarkson, B. D.: Flow microfluorometric analysis of cell killing with cytotoxic drugs. J. Histochem., 22, 651-659 (1974).

- 27) Tobey, R. A. & Crissman, H. A.: Use of flow microfluorometry in detailed analysis of chemical agents on cell cycle progression. *Cancer Res.*, **32**, 2726-2732 (1972).
- 28) Moran, R. E. & Straus, M. J.: Synchronization of L1210 leukemia with hydroxyurea infusion and the effect of subsequent pulse dose chemotherapy. *Cancer Treat. Rep.*, **64**, 81-86 (1980).
- 29) Taylor, I. W. & Tattersall, M. H. N.: Methotrexate cytotoxicity in cultured human leukemic cells studied by flow cytometry. *Cancer Res.*, **41**, 1549-1558 (1981).
- 30) 太田和雄・高本 滋・御供泰治: DNA 瞬間自動測定装置. 癌と化学療法, **4**, 179-184 (1977).
- 31) 高本 滋・加藤武俊・太田和雄: F.M.F. による抗癌剤の作用機序に関する研究 (第1報) - MFC 療法を中心に - 癌と化学療法, **5**, 145-153 (1978).
- 32) 太田和雄・高本 滋: 細胞回転と抗癌 - 化学療法の立場から - 癌の臨床, **27**, 1499-1506 (1981).
- 33) 林 正岳・富田勝郎・宗広忠平・野村忠雄・中村孝・清水俊治・千葉英史・平井 純・三平伸一・横川明男・野村 進: Sr89 発現骨肉腫マウスに対する化学療法の効果 (Flow cytometry による検討). 中部整災誌, **25**, 847-849 (1982).
- 34) 平井 純・富田勝郎・林 正岳・三平伸一・横川明男・野村 進: ヒト骨肉腫由来培養細胞株 (OST strain) における抗癌剤の cell cycle に及ぼす影響 (Flow cytometry を用いて). 中部整災誌, **26**, 716-721 (1983).
- 35) 高瀬武平・山崎安朗・井村慎一・安元三郎・布谷猛・森田聖一・宮沢洋一・荒川弥二郎・高田克弘・山田清夫: 組織培養法によるヒト骨肉腫の研究. 中部整災誌, **7**, 577-589 (1964).
- 36) 羽柴秀雄: ³H-Thymidine Microautoradiography によるヒト骨肉腫由来細胞の研究. 中部整災誌, **11**, 347-368 (1968).
- 37) Krishan, A., Pitman, S. W., Tattersall, M. H. N., Payka, K. D., Smith, D. C. & Frei, E.: Flow microfluorometric patterns of human bone marrow and tumor cells in response to cancer chemotherapy. *Cancer Res.*, **36**, 3813-3820 (1976).
- 38) 渡部郁雄: 新しい技法による細胞動態の研究. 遺伝, **34**, 197-206 (1980).
- 39) Cohen, S. S. & Barnar, H. D.: Special article- The death of bacteria as a function of unbalanced growth. *Pediatrics*, **16**, 704-708 (1955).
- 40) Skipper, H. E., Schabel, F. M. Jr., Mellett, L. B., Montgomery, J. A., Wilkoff, L. J., Lloyd, H. H. & Brockman, R. W.: Implications of biochemical, cytokinetic, pharmacologic and toxicologic relationships in the design of optimal therapeutic schedules. *Cancer Chemother. Rep. Part I*, **54**, 431-449 (1970).
- 41) Wheeler, G. P., Bowdon, B. J., Adamson, D. J. & Vail, M. H.: Comparison of the effects of several inhibitors of the synthesis of nucleic acids upon the viability and progression through the cell cycle of cultured H. Ep. NO.2 cells. *Cancer Res.*, **32**, 2661-2669 (1972).
- 42) Creasey, W. A.: Effect of the vinca alkaloids on RNA synthesis in relation to mitotic arrest. *Fed. Proc. (abstracts)*, **27**, 760 (1968).
- 43) Madoc-Jones, H. & Mauro, F.: Interphase action of vinblastine and vincristine: Differences in their lethal action through the mitotic cycle of cultured mammalian cells. *J. Cell Physiol.*, **72**, 185-196 (1968).
- 44) Palmer, C. G., Livengood, D., Warren, A. K., Simpson, P. J. & Johnson, I. S.: The action of vincalutoblastine on mitosis in vitro. *Exp. Cell Res.*, **20**, 198-201 (1960).
- 45) DiMarco, A., Gaetani, M. & Scarpinato, B.: Adriamycin (NSC-123127): A new antibiotic with antitumor activity. *Cancer Chemother. Rep.*, **53**, 33-37 (1969).
- 46) Kim, S. H. & Kim, J. H.: Lethal effect of adriamycin on the division cycle of HELA cells. *Cancer Res.*, **32**, 323-325 (1972).
- 47) Barranco, S. C., Gerner, E. W., Burk, K. H. & Humphrey, R. M.: Survival and cell kinetics effects of adriamycin on mammalian cells. *Cancer Res.*, **33**, 11-16 (1973).
- 48) Barlogie, B., Drewinko, B., Johnston, D. A. & Freireich, E. J.: The effect of adriamycin on the cell cycle traverse of a human lymphoid cell line. *Cancer Res.*, **36**, 1975-1979 (1976).
- 49) 太田和雄・御供泰治・高本 滋: 癌細胞の動態と治療法との関係. 癌の制圧 - 最近の治療学 - 癌の化学, **5**, 19-46, 南江堂, 東京, 京都, 1979.
- 50) 平井 純: ヒト骨肉腫由来培養細胞株 (OST strain) における抗癌剤の cell cycle に及ぼす影響 (flow cytometry を用いて). 十全医学会誌投稿中.
- 51) 下山正徳・木村禧代二: 白血病化学療法剤の作用機序 (2) 抗白血病剤の cell kinetics について. 臨床

科学, 11, 605-614 (1975).

Experimental Study on the Combination Chemotherapy for Osteosarcoma – Flow Cytometric Analysis on a Human Osteosarcoma OST Cell Line In Vitro Shinichi Mihira, Department of Orthopedic Surgery, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920 – J. J. J. Med. Soc., 95, 53–73 (1986)

Key words: flow cytometry, osteosarcoma, combination chemotherapy

Abstract

The present study was made to examine the effects of combination chemotherapy on the cell cycle traverse of a human osteosarcoma OST cell line in cultivation and to establish a useful treatment schedule for osteosarcoma. Methotrexate (MTX), vincristine (VCR) and adriamycin (ADM), which have been preferably used for treatment of osteosarcoma patients, were adopted in various combined formulas. Flow cytometric patterns of the treated OST cells in response to these anticancer agents were analysed relating to their proliferative profiles and morphologic changes.

When OST cells were exposed to MTX in nutrient medium, followed by VCR or ADM, marked inhibition of cell growth and variation of DNA histograms were demonstrated, because pretreatment with MTX prior to VCR or ADM caused a G1-S boundary accumulation.

In the case of ADM, most of the OST cells exposed to this antibiotic was proved to accumulate at G2 phase of the cell cycle. Then, even if MTX or VCR was given after the treatment with ADM, inhibitory effect on the cell growth was only the same as that of ADM alone.

Meanwhile, when OST cells were exposed to VCR, followed by MTX or ADM, no apparent increase in mitotic cells was observed, though VCR has an activity to cause M phase accumulation, namely metaphase arrest.

However, the treatment with VCR after MTX was efficiently active to induce metaphase arrest.

DNA histograms of OST cells exposed for 24 hours to each anticancer agent in various combination were investigated.

From the results obtained, it was considered that the treatment with MTX, followed by VCR and ADM in order might be useful and rational in combination chemotherapy with these anticancer agents for osteosarcoma patients.